Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)

und

aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation
mit EURATOM, München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

BESTIMMUNG DER ABSOLUTEN ZELLZAHL MENSCHLICHEN KNOCHENMARKES UNTER KOAGULUM-KULTUR-BEDINGUNGEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der ehem.
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Peter Ramdohr

aus Berlin

1970

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)

und

aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation
mit EURATOM, München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

BESTIMMUNG DER ABSOLUTEN ZELLZAHL MENSCHLICHEN KNOCHENMARKES UNTER KOAGULUM-KULTUR-BEDINGUNGEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der ehem.
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Peter Ramdohr
aus Berlin

Ehem. Dekan: Professor Dr. med. Herbert Lax
Referent: Professor Dr. med. Irene Boll
Korreferent: Professor Dr. med. Horst Brücher

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der ehem. Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 9. November 1970

In Dankbarkeit meinem Vater gewidmet, dessen Leben und 40jährige Arbeit als praktischer Arzt mir immer Vorbild sein werden.

INHALTSANGABE

Seite

EINLEITUNG

A) Entwicklung der Knochenmarkzüchtung und der hämatologischen Diagnostik 7

B) Mitotischer Koeffizient und stathmokinetischer Index 9

C) Morphologische Veränderungen unter Kulturbedingungen 10

D) Bedeutung der absoluten Zellzahl anhand von Verlaufsbeobachtungen 10

QUANTITATIVE ZELLZAHLBESTIMMUNG AN MENSCHLICHEM KNOCHENMARK

A) Anfänge quantitativer Messungen und Markkonzentrationsversuche 13

B) Einteilung und Darstellung bisheriger Bestimmungsmethoden 14

I Indir. Methoden 14

II Direkte Methoden 15

C) Auflösung von Zellverbänden 16

I Mechanische Auflösung 16

II Auflösung mit Hilfe Komplex-bildender Substanzen 16

III Enzymatische Spaltung 16

1. Trypsinauflösung und Ermittlung der erforderlichen Fermentkonzentration 17

2. Trypsininhibierung 20

D) Beschreibung und Erklärung des von uns angewandten Verfahrens 21

I Sternalpunktion 21

II Deckglaskultur 22

III Volumenmessung 23

		Seite
IV	Trypsinaufarbeitung, d. h. fermentative Bröckelauflösung	24
V	Zellzählung	26
E)	Ergebnisse und Interpretation	31
I	Getrennte Bestimmung mobiler Zellen des Knochenmarkbröckels	32
II	Abhängigkeit der Gesamtzellzahl von dem Volumen des inkubierten Bröckels	33
III	Zellzahlbestimmung unter Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien wie CORHORMON und HÜHNER-EMBRYONALEXTRAKT	36
IV	Bakterielle Verunreinigungen	36
V	Reproduzierbarkeit der Methode	37
F)	Diskussion	37
I	Vergleich mit der absoluten Zellzahl nach Punktion (Claus)	37
II	Die quantitativen Ergebnisse der Verlaufsbeobachtung	38
ZUSAMMENFASSUNG		40
LITERATURVERZEICHNIS		41
LEBENSLAUF		47

A) ENTWICKLUNG DER KNOCHENMARKZÜCHTUNG UND DER HÄMATOLOGISCHEN DIAGNOSTIK

Seit HARRISON 1907 die Technik der Gewebezüchtung beschrieb und CARREL und BURROW 1910 erste Versuche mit Katzenknochenmark durchführten, haben die Kenntnisse über das Knochenmark in Gewebekulturen ständig zugenommen.

Arbeiten von FOOT, ERDMANN und RASMUSSEN, die für ihre invitro Züchtungen ebenfalls tierisches Mark benutzten, wiesen neben wesentlichen cytomorphologischen Einzelheiten bereits auf das Ausgangsprodukt der Differenzierungsvorgänge, die Mesenchymzelle hin, die gleichzeitig das Endprodukt der Entdifferenzierung darstellt. (8)

Da die an tierischem Material gewonnenen Kenntnisse nicht ohne weiteres auf menschliches hämatopoetisches Gewebe zu übertragen sind, arbeiteten amerikanische Forscher, besonders OSGOOD und BROWNLEE mit humanem Knochenmark. Die hierbei verwandte Methode wurde erstmals von GEY beschrieben, der die ROLLER TUBE METHOD verwandte. Das Gewebe wird hierbei auf eine dünne Fibrinschicht gebracht, die einer Röhrcheninnenwand gleichmäßig aufliegt und mit Nährlösung beschichtet. Der periodischen Versorgung mit dieser Lösung dient ein Roller, der während der gesamten Züchtungsdauer die Röhrchen im Brutschrank ca. 15 mal pro Stunde um seine horizontale Achse bewegt.

Zu gleicher Zeit züchtete in Deutschland WEIZMANN menschliches Knochenmark in Carrelflaschen und beschrieb verschiedene Methoden des Wachstums einer Kultur. Zusammen mit den Arbeiten des Italieners FIESCHI wiesen diese Beobachtungen nach, daß Kulturen menschlichen Knochenmarkes gleiche Entdifferenzierungen zeigten, wie sie bei tierischem Mark zuvor beschrieben waren. Darüberhinaus wurde von der italienischen Schule bereits das Verhalten von pathologisch verändertem Knochenmark, so bei akuten Leukämien und Megaloblastenmark beobachtet.

In Anlehnung an die von FIESCHI und ASTALDI beschriebene Deckglaskultivierung wurde 1950 von ALBRECHT und BOLL ein vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung menschlichen Knochenmarkes in-vitro angegeben.(1) Unter Hinweis auf den relativ geringen methodischen Aufwand wird die Möglichkeit aufgezeigt, Verhalten und Funktion überlebender Knochenmarkzellen direkt zu beobachten.

Die Bröckelzüchtung ist wie sämtliche anderen Kulturverfahren für humanes Mark an die Entnahme beim Lebenden gebunden. Nur wenige Stunden nach dem Tode gelingt die Lebendbeobachtung trotz sorgfältigster Präparation nicht mehr und brauchbare Ausstriche sind nicht zu erhalten.

Neben der Beobachtung physiologischer oder pathologischer Wachstums- oder Differenzierungsvorgänge ist die medikamentöse Beeinflussung einer Kultur zu verfolgen und da die meisten Blutkrankheiten Erkrankungen blutbildender Organe sind, ermöglicht der Rahmen dieser 3 Tage Kultivierung sowohl eine direkte Beobachtung hämatopoetischen Knochenmarkes, als auch die prognostische Beurteilung des Verlaufes von Hämoblastosen unter cytostatischer Behandlung. Daneben ist die Gewebezüchtung aus der experimentellen Biologie und Pathologie nicht mehr fortzudenken, zusammen mit der Cytomorphologie ist durch die Anwendung der invitro Züchtung der Hämatologie eine wertvolle Hilfe entstanden.

Die hämatologische Diagnostik entwickelte sich in den Jahren zwischen 1900 und 1950 auf der Grundlage ausdrucksfähiger Färbemethoden. Die Einführung einer klinisch brauchbaren Punktionsnadel 1929 durch den Russen ARINKIN und die Wahl des Brustbeines als Punktionsstelle schufen weitere Möglichkeiten für eine leicht durchführbare und wenig aufwendige diagnostische Maßnahme. Gegenüber der Trepanation des Beckenkammes oder der Dornfortsätze der oberen Lendenwirbel trifft man bei der Sternalpunktion auf fast gleichbleibendes hämatopoetisch aktives Gewebe.

B) MITOTISCHER KOEFFIZIENT UND STATHMOKINETISCHER INDEX

Infolge natürlicher Reifung und Teilung der Zellen des Knochenmarkbröckels unter Kulturbedingungen tritt eine Verschiebung der Zusammensetzung einzelner Zellklassen auf. Der Teilungsvorgang selbst ist an den unterschiedlichen Mitosephasen zu erkennen und findet seinen Ausdruck im Mitoseindex.

Für die Bestimmung der Anzahl der Mitosen wird der gefärbte Ausstrich des Quetschpräparates zugrunde gelegt. Nach Auszählung von 1.000 Zellen und deren Differenzierung unter Kenntnis der Mitosehäufigkeit einzelner Zellklassen wird der Prozentsatz der Zellteilungen innerhalb einer Zellpopulation festgelegt. Der mitotische Koeffizient (M I) bestimmt die Zahl der Mitosen (M) in promille pro Anzahl ruhender Zellen (R)

$$M\,I = 1.000\ M/R.$$

Bei Zugabe von Colchicin in das Nährmedium tritt eine progressive Erhöhung des Mitoseindex auf. Da die Ausbildung einer Spindel verhindert wird, ist der Mitoseablauf nur von der Prophase bis zur frühen Metaphase möglich, durch deren Anreicherung sich M I erhöht. Der entsprechende mitotische Koeffizient wird als STATHMOKINETISCHER INDEX bezeichnet.

Aus der Kenntnis der Mitosehäufigkeit, der Reifungsdauer und der relativen Verschiebung einzelner Zellklassen im Rahmen der Zellteilungs- und Differenzierungsvorgänge pro Zeiteinheit kann die Entwicklung einer Blutzellpopulation mathematisch behandelt werden. Das Ergebnis ist eine Vorausberechnung der relativen Zellverteilung für beliebige Zeiten. (9)

Der Verlauf einer Kultur kann unter Berücksichtigung der zeitlichen Verschiebung einzelner Klassen im Myelogramm d. h. anhand von Reifungskurven dargestellt werden.

C) MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN UNTER KULTURBEDINGUNGEN

Makroskopisch ist bereits 5 - 12 Stunden nach Inkubation die Zellproliferation durch das Auftreten eines opalescierenden Randsaumes um das Mutterstück zu beobachten. Dieser Saum nimmt in der Folgezeit an Durchmesser und Intensität zu und besteht aus mobilen Zellen, die den Bröckelverband verlassen. Ihre Zusammensetzung unterscheidet sich nicht wesentlich von der des Zentralstückes.

Cytologisch erkennt man nach 12 Stunden reichlich Erythroblasten unterschiedlicher Reifegrade und aus der weißen Reihe Myeloblasten, Promyelocyten und Metamyelocyten. In der Auswanderungszone ist die Zahl der stab- und segmentkernigen Leukozyten leicht erhöht.

24 Stunden nach Ansetzen der Kultur sind diese Zellen noch gut erhalten, reife Granulocyten nehmen ab, während die Zahl unreifer Formen ansteigt. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Zunahme retikulohistiocytärer Elemente, die teilweise untergehende Blutzellen phagocytieren. In 6 - 8 Tage alten Kulturen beherrschen Fibroblasten das Gesamtbild, daneben sind guterhaltene Lymphozyten erkennbar. (7)

Mit zunehmendem Alter der Kultur werden reife und unreife Zellformen gegenüber äußeren Einflüssen empfindlicher. Dies drückt sich in schlechter Anfärbbarkeit und leichter Zerstörbarkeit bei Ausstrichen aus.

D) BEDEUTUNG DER ABSOLUTEN ZELLZAHL ANHAND VON VERLAUFSBEOBACHTUNGEN

Zusammen mit der cytomorphologischen Betrachtung ist die Kenntnis der absoluten Zellzahl und ihre Änderung unter Kulturbedingungen wichtig.

Als Ausdruck der Wachstumsvorgänge werden Reifungskurven und

als Parameter der Regeneration Mitoseindices herangezogen. Die Proliferationskinetik läßt sich unter Zugrundelegung dieser relativen Werte, die nur eine anteilmäßige Zusammensetzung innerhalb einer zahlenmäßig definierten Einheit wiedergeben, weniger gut kalkulieren, als lägen absolute Zellzahlen vor. Gemeinsam mit einer genauen zeitlichen Kontrolle von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen sind diese auch im Zusammenhang mit krankhaften Zellteilungsabläufen von therapeutischer und prognostischer Bedeutung.

Versuche, die Zellzahl im Knochenmark zu bestimmen, auch unter Kulturbedingungen, sind vielfach unternommen worden. (18) Daß diese Zählungen bisher keine allgemeine Verbreitung gefunden haben, liegt nach ROHR allein an der großen Fehlerbreite bisher bekannter Methoden, deren Ursachen in ungenügender Aufarbeitung der Knochenmarkbröckel und mangelhafter Trennung von peripheren Blutbestandteilen liegen.

Aufgabe der folgenden Arbeit ist die quantitative Verlaufsbeobachtung von Knochenmarkbröckelkulturen über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden unter Beachtung der oben aufgeführten Fehlermöglichkeiten.

QUANTITATIVE ZELLZAHLBESTIMMUNG AN MENSCHLICHEM KNOCHENMARK

A) ANFÄNGE QUANTITATIVER MESSUNGEN UND MARKKONZENTRATIONSVERSUCHE

Erste quantitative Bestimmungen an menschlichem Knochenmark wurden in den Jahren nach 1930 vorwiegend in Skandinavien vorgenommen. Sie führten zu erheblichem Zweifel an den allgemein gültigen Vorstellungen der Entstehung der Erythrocyten und Granulocyten aus dem Knochenmark. Diese, als MARKKONZENTRATIONSVERSUCHE nach WEICKER in die Literatur eingegangenen Zählungen wurden nach Knochenmarkpunktion und anschließender Aspiration von 1 bis 10 ml "Knochenmarkflüssigkeit" vorgenommen. (20) Nach gutem Durchschütteln des Aspirates werden die kernhaltigen Blutkörperchen ausgezählt. Hierauf basierende Berechnungen unter Bezug auf die Zellbildungspotenz führten bereits rechnerisch zu dem Schluß, daß das gesamte menschliche Knochenmark nicht täglich etwa 200×10^9 Erythrocyten zu bilden vermag. WEICKER wies 1953 nach, daß bereits eine Erythroblastenmenge von 200 ml für eine Erythropoese dieses Ausmaßes genügt.

Der Hauptfehler der Markkonzentrationswerte lag in der Beimischung von Marksinus- und peripherem Blut, die um so größer ist, je mehr und je länger bei der Punktion aspiriert wird.

Die Aufklärung und Interpretation dieser Vorgänge hängt eng mit der Zunahme der Kenntnisse anatomischer Markverhältnisse zusammen. Das Organ der Erythropoese ist nach WEICKER nicht das Knochenmark als Ganzes, sondern das Erythron, eine räumliche Erythroblastenanordnung mit endostnahen Zellteilungszonen und sinusnahen Zellreifungsgebieten. Im Ausstrich imponieren diese als Erythroblastennest.

B) EINTEILUNG UND DARSTELLUNG BISHERIGER BESTIMMUNGSMETHODEN

Aus Gründen besserer Übersicht können die weiteren Bestimmungen mit dem Ziel einer quantitativen Zellzählung in zwei Verfahren unterteilt werden.

I INDIREKTE METHODEN

Die Parameter indirekter Bestimmungen sind stets bestimmte Zelleigenschaften, die quantitativ erfaßt werden. Ihre Änderung gestattet Rückschlüsse auf die Gesamtzellzahl.

Hierzu zählt die Flächenbestimmung des mikroskopischen Bildes einer Gewebekultur und ihre Zunahme durch planimetrische Messung der Vergrößerung der Wachstumszone. Durch den Flächenzuwachs pro Zeiteinheit kann bei Kenntnis der Einzelgröße eine Zellzahlvermehrung nachgewiesen werden. Dieses Verfahren eignet sich jedoch nur für flächenhaft wachsende Gewebe, es entfällt für die dreidimensionale Ausbreitung einer Knochenmarkbröckelkultur.

Photometrische Analysen der Gesamtproteine, der Nucleinsäuren oder ihrer Bestandteile gestatten ebenfalls quantitative Aussagen durch die Zunahme organischer Verbindungen bei Teilungs- und Wachstumsvorgängen invitro.

Weiter kann durch den Hämatokritwert nach VAN ALLEN die Aufschwemmung gezüchteter Zellen bestimmt werden. Mit Hilfe der Zentrifugalkraft gelingt eine Trennung der geformten Bestandteile einer Suspensionskultur von dem flüssigen Nährmedium. Die Zellmenge ergibt sich aus der Säulenhöhe der sedimentierten Bestandteile und einer empirisch festgesetzten Eichkurve.

II DIREKTE METHODEN

Die direkte Zellzahlbestimmung stellt unter einer Voraussetzung keine große Schwierigkeit dar. Diese ist in der Flüssigkeitskultur erfüllt, in der die Zellen einzeln suspendiert vorliegen und dadurch wie Blutkörperchen behandelt werden können. Durch die Einführung des Zählkammerverfahrens und durch automatische Zähleinrichtungen sind hier Standardmethoden geschaffen worden. Die Anwendung bei Suspensionskulturen erfolgt unter ähnlichen Bedingungen wie bei der quantitativen Blutzellbestimmung: nach entsprechender Verdünnung und sorgfältigem Durchmischen in einer Mischpipette wird eine Zählkammer beschickt und nach mikroskopischer oder mechanischer Auszählung mathematisch ein Mittelwert bestimmt und der Zellgehalt pro mm^3 ermittelt.

Diese Auszählung ist von SANDFORD auch zur Bestimmung der Zellkerne angegeben worden. Mit Hilfe von Zitronensäure wird das Protoplasma der Zellen zerstört, während die Kerne übrig bleiben und im Zählkammerverfahren bestimmt werden können. (16)

Während die quantitative Bestimmung von Zellsuspensionen kein großes Problem darstellt, macht der zusammenhängende Zellverband diese Messung zunächst unmöglich. Gelingt die Auflösung des Zellverbandes, d. h. die Zerstörung oder Lösung der Zwischenzellsubstanz ohne die Zellen zu beschädigen, ist das Zählkammerverfahren auch für zunächst zusammenhängende anatomische Gebilde, wie das Knochenmarkbröckel, anwendbar.

Im Verlauf einer Knochenmarkbröckel-in-vitro-Züchtung kommt es bereits 6 Stunden nach Beginn der Inkubation zu einer Auswanderung kernhaltiger Zellen aus dem festen Bröckelverband. Dieser Vorgang ist deutlich sichtbar, die Zellen sind (Seite 10) als opalescierender Randsaum beschrieben. Der geschilderte Ablauf entspricht den physiologischen Reifungs- und Teilungsvorgängen hämatopoetischen Gewebes in vivo und stellt eine gemeinsame Antwort auf unterschiedliche Reize dar. Eine Bestimmung dieser Zellen nach dem Zählkammerverfahren bereitet keine Schwierigkeiten.

Das Mutterstück bleibt jedoch während der gesamten Inkubationsdauer von 48 bis 72 Stunden als anatomischer Zellverband bestehen. Die Aufarbeitung mit dem Ziel einer zählbaren Zellaufschwemmung ist hier nicht zu umgehen.

C) AUFLÖSUNG VON ZELLVERBÄNDEN

Die Auflösung von Zellverbänden und die Überführung in eine auszählbare Suspension ist prinzipiell nur durch die Zerstörung der Zwischenzellsubstanz, im wesentlichen auf drei Arten möglich:

I Mechanische Auflösung

II Auflösung mit Hilfe Komplex-bildender Substanzen

III Enzymatische Spaltung

Zu I) Bei der mechanischen Zerkleinerung von Gewebsverbänden, ob durch Zerstückelung, durch intensives Schütteln oder mit mechanischen Magnetrührwerken bleiben einerseits noch zusammenhängende Zellaggregate, in denen die Zellzahl nicht exakt bestimmt werden kann bestehen, während andererseits bei intensiver mechanischer Bearbeitung die Zahl der Zelltrümmer keine genaue Messung erlaubt.

Zu II) Komplexverbindungen sind valenzchemisch abgesättigt erscheinende Substanzen, die mit gewissen anderen Molekülen oder Ionen noch weiterhin zu reagieren und kompliziert aufgebaute Stoffe zu bilden vermögen. (12) Diese in der englischen Literatur Chelating Agents genannten Substanzen können bivalente Kationen wie z. B. Calcium und Magnesium binden. Bestimmte epitheliale Gewebe benötigen diese Ionen für ihren Zusammenhalt. Bei Behandlung mit Citrat oder Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) werden Calcium und Magnesiumionen gebunden, der Zellverband löst sich auf. (15)

Zu III) Die enzymatische Trennung der Zwischenzellsubstanz beruht auf der fermentativen Spaltung bestimmter fibrillärer Proteine wie Collagen, Elastin und Keratin und einer Reihe von Mucopolysacchariden vom Typ der Hyaluronidinsäure und der Chondroitinschwefelsäure.

Entsprechend der Vielzahl ihrer Bausteine gelingt die Spaltung der Intercellularsubstanz mit einer ganzen Reihe von Fermenten wie Kollagenasen, Elastasen, Mucasen, Hyaluronidasen, Trypsin und Pankreatin sowie Papain, einem Proteasengemisch aus der Papayapflanze. (13) Neben der unterschiedlichen Eiweißzusammensetzung schwankt die Konzentration elastischer Proteine, der Mucopolysaccharide und weiterer organischer und anorganischer Bestandteile einschließlich des Wassergehaltes von Gewebe zu Gewebe. Dies macht verständlich, daß eine ausreichende enzymatische Auflösung nur von spezifischen Fermenten in jeweils unterschiedlicher Verdünnung möglich ist.

1916 beschrieben erstmals ROUS und JONES die fermentative Auflösung von Zellverbänden mit Hilfe von Trypsin für Kulturzwecke. 1952 wurde diese Methode von MOSCONA aufgegriffen und zur Vereinzelung von EMBRYONIC LIMB BUDS von 4 bis 5 Tage alten Hühnerembryonen verwandt. Später wurde die Auflösung durch Trypsin von DULBECCO und 1954 von YOUNGNER im Rahmen virologischer Untersuchungen benutzt. Das Ergebnis bestand in einer zahlenmäßig bestimmbaren Suspension von Affennierenzellen. (14, 15)

1 TRYPSINAUFLÖSUNG UND ERMITTLUNG DER ERFORDERLICHEN FERMENTKONZENTRATION

Üblicherweise wird Trypsin in der Gewebsauflösung in Konzentrationen angewandt, die zwischen 2 % und 1 % liegen. Darüberhinaus sind jedoch Fermentverdünnungen bis 0,025 % bei entsprechend verlängerter Einwirkungszeit als wirksam beschrieben. (15)

Die im Rahmen unserer Untersuchungen ermittelte optimale Trypsinkonzentration für die Auflösung frischen menschlichen Knochenmarkgewebes lag bei 0,05 % bei einer Einwirkungszeit von 15 Minuten.

Bei der fermentativen Aufarbeitung der Knochenmarkbröckel nach 24 bis 72stündiger Inkubation erwies sich diese Konzentration auch bei verkürzter Reaktionszeit als zu hoch. Der Vorgang der Cytolyse konnte durch das Auftreten von Zelltrümmern und isolierten Zellkernen neben intakten Zellen erkannt werden. Die ausreichende Auflösung der Inter-

zellularsubstanz bei intakt gebliebenen Zellen wurde bei einer Trypsinkonzentration von 0,025 % beobachtet. Die erforderliche Bebrütungszeit betrug 10 Minuten bei 37^{o} C. (Routinemethode)

Neben der Fermentkonzentration und der empirisch gewonnenen Einwirkungszeit ist die strenge Einhaltung weiterer Kriterien zu beachten. Es ist dies die sogenannte Schüttelzeit, d. h. die Zeit, die nach der Bebrütung zusätzlich erforderlich ist, um eine vollständige Auflösung des Gewebsverbandes zu erreichen. Sie beträgt bei der Arbeit mit Bröckelkulturen gleicher Größe (etwa 1/3 mm^3) 60 Sekunden.

Daneben ist die Einhaltung einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration erforderlich. Das Wirkungsoptimum für das Ferment Trypsin liegt bei einem ph-Wert von 7 bis 9. In saurerem Milieu ist das Ferment inaktiv, stärker alkalische Werte führen in Gegenwart des Fermentes zur Zerstörung der Zellen.

Verschiedentlich wurden bei vollständiger Auflösung des Gewebsverbandes spiral- bzw. treppenartige fadendünne Zellanhängsel beobachtet. Diese bestehen aus bestimmten fibrillären Proteinen und sind bei der Anwendung kristallinen Trypsins zur Gewebsauflösung beschrieben. (15) Sie sind durch Pankreatin völlig auflösbar, was für unsere Versuche jedoch nicht erforderlich ist, da diese Anhängsel bei der Auszählung der Suspension nicht hinderlich sind.

	Kulturzeit (h)	Trypsinkonzentration (‰)	Bebrütungszeit (min)	Schuttelzeit (sec)	Zellzahl pro (mm³/Suspension)	Beurteilung
	24	0.05	15	60	39	viele Zelltrümmer, einzelne Kerne
	24	0.05	10	60	51	viele Zelltrümmer
	24	0.05	5	60	67	wenige Trümmer, einzelne Kerne
	24	0.025	15	60	92	gute Zellform, vereinzelte Zellkomplexe ca. 10 – 15 Zellen
Routine-methode	24	0.025	10	60	109	guterhaltene Zellen, Stechapfel erkennbar
Routine-methode	24	0.025	10	60	114	gute Suspension, keine Trümmer, keine Zellverbände
Routine-methode	48	0.025	10	60	99	sehr wenig Trümmer, gute Zellform
	48	0.025	5	60	89	gute Zellform, keine Trümmer, keine Komplexe
	48	0.000	10	60	44	wenige Trümmer, mehrere nicht zählbare Komplexe

Tab. 1: Ermittlung der erforderlichen Trypsinkonzentration in Abhängigkeit von der fermentativen Trypsineinwirkung (Trypsinkonzentration und Bebrütungszeit)

2 TRYPSININHIBIERUNG

Nach erfolgter Zerstörung der Zwischenzellsubstanz, mikroskopisch erkennbar durch ausreichende Vereinzelung der Zellen, kann die Fermentaktivität auf verschiedene Weise beendet werden. Neben einer rein mechanischen Trennung durch Sedimentation und anschließendem Waschen der Zellen kommen theoretisch eine ganze Reihe von Substanzen in Betracht, die unter dem Begriff Trypsininhibitoren zusammengefaßt werden können und unter physiologischen Bedingungen z. B. aus menschlichem Plasma, Urin oder der Muttermilch zu isolieren sind. (6, 11, 17)

Versuche mit dem Trypsininhibitor TRASYLOL ^{R}, der uns dankenswerter Weise von der Firma FARBENFABRIKEN BAYER zur Verfügung gestellt wurde, wiesen bei unserer Versuchsanordnung eine ungenügende Fermentinaktivierung auf.

Die Anwendung von Kälte und Jod in Form LUGOLSCHER LÖSUNG, einer wässrigen Jodjodkaliverbindung, zeigte eine ausreichende Beendigung der fermentativen Trypsinwirkung, ohne zu erkennbaren Zellschäden zu führen. Nach LEUTHARD beruht diese Wirkung auf einer teils reversiblen Blockierung freier SH Gruppen des Fermentes. (13)

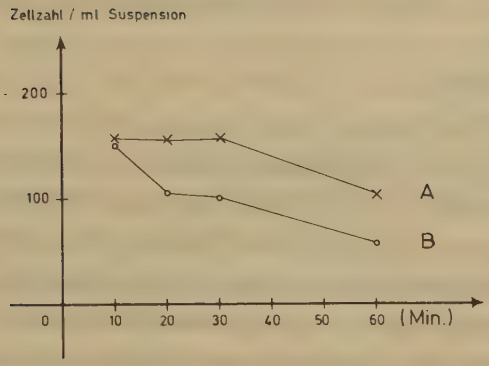

Abb. 1 zeigt das Verhalten einer durch Trypsinauflösung hergestellten Zellsuspension

A nach Unterbrechung der Fermentwirkung durch LUGOLSCHE LÖSUNG und Kälte

B ohne Zusatz

D) BESCHREIBUNG UND ERKLÄRUNG DES VON UNS ANGEWANDTEN VERFAHRENS

Nach erfolgter Sternalpunktion werden einzelne Knochenmarkbröckel volumetrisch bestimmt und in eine vorbereitete Deckglaskultur gegeben. Mit Ablauf der Inkubationszeit erfolgt eine Trennung mobiler Zellen von dem Bröckelverband, der fermentativ aufgearbeitet wird. Die Auszählung der Zellen des Markbröckels und der ausgewanderten Zellen erfolgt getrennt im Zählkammerverfahren.

I STERNALPUNKTION

Als Punktionsstelle dient die Sternalmitte in Höhe des 2. bis 3. ICR. Nach sorgfältiger Desinfektion und Infiltrationsanästhesie wird eine mit einem Mandrain und einer Arretierungsvorrichtung versehene Punktionskanüle senkrecht in den Spongiosaraum gestoßen. Nach Entfernung

des Mandrain wird mit einer aufgesetzten großen Recordspritze ein Vakuum ruckartig erzeugt und dabei 0,2 bis 0,5 ml blutigen Markes asperiert. Die so erhaltene Flüssigkeit wird in ein steriles Blockschälchen, das eine verdünnte Heparinlösung enthält, ausgespritzt.

II DECKGLASKULTUR

Nach Entnahme von einzelnen Bröckelchen zu Ausstrichen in Form von Quetschpräparaten zu diagnostischen Zwecken werden weitere Bröckel mit Hilfe steriler Häkchen in ein mit gleicher Heparinlösung befindliches Blockschälchen überführt und auf diese Weise von den anhaftenden Elementen des peripheren Blutes befreit. Die Kultur selbst entsteht durch das Überführen eines oder mehrerer Markbröckel auf vorbereitete Objektträger. Diese enthalten als Kulturmedium einen Koagulumtropfen, der aus Blutplasma, Corhormon und physiologischer Nährsalzlösung besteht. Das auf dem Koagulum befindliche Knochenmarkbröckel wird mit einem kleinen Tropfen möglichst homologen Serums abgedeckt. Nach Fixierung eines Hohlschliffobjektträgers durch zwei Vaselinetupfen und Luftverschluß der Ränder durch flüssiges Hartparaffin wird die entstandene Kammer um 180° gedreht. Es entsteht so eine Kultur am hängenden Tropfen, die im Brutschrank bei 37° inkubiert wird.

Eine Verlaufsbeobachtung über 3 Tage benötigt etwa 6 volumetrisch bestimmte Kulturen, da es sich als zweckmäßig herausgestellt hat, Doppelbestimmungen durchzuführen. Daneben werden im Rahmen der klinischen Fragestellung und für die weitere Beurteilung Ausstriche angefertigt, die nach Lufttrocknung und Färbung nach MAY-GRÜNWALD oder PAPPENHEIM oder anderen spezielleren Methoden wie ein Differenzialblutbild behandelt werden.

Die von uns durchgeführte Deckglaskultur menschlichen Knochenmarkes ist eine Routinemethode und wird im Rahmen der Markdiagnostik seit 10 Jahren für klinische und experimentelle Fragestellungen im HÄMATOLOGISCHEN FORSCHUNGSLABOR des STÄDTISCHEN KRANKENHAUSES BERLIN-NEUKÖLLN angewandt.

III VOLUMENMESSUNG

Das mittels Sternalpunktion an typischer Stelle gewonnene Material besteht aus Knochenmarkbröckeln, Blut und vereinzelten Spontiosateilchen. Das Aspirat wird aus der Recordspritze in ein steriles Zentrifugenglas gespritzt, das eine 37° C warme Lösung aus 8 ml physiologischer Kochsalzlösung und 2 ml Natrium-citricum Lösung enthält und mit einem sterilen Gummistopfen verschlossen. Hierbei ist bereits auf peinliche Sterilität zu achten, bakterielle Verunreinigungen können die Ergebnisse von Kulturen erheblich beeinflussen.

Während unmittelbar mit der fermentativen Aufarbeitung eines zuvor volumetrisch bestimmten Knochenmarkbröckels begonnen wird, werden die zur Inkubation vorgesehenen Bröckel weiter unter sterilen Bedingungen behandelt und ihr Rauminhalt gesondert bestimmt.

Hierfür werden handelsübliche Hb Pipetten der Marke RESISTANCE benutzt, die an ihrer Spitze um etwa 5 mm gekürzt sind. Während dieses Ende plangeschliffen wird, wird die andere Pipettenseite mit einem Schlauch mit Mundstück versehen. Das Volumen der Pipette wurde vor Beginn der Arbeiten im Berliner Eichamt mit Hilfe von Quecksilber geprüft. Die weitere Handhabung der Pipette entspricht dem üblichen Verfahren des Aufsaugens von Blut aus der Fingerbeere oder dem Ohr. (10)

Die mit anhaftendem Blut und Spongiosateilchen verunreinigten Knochenmarkbröckel werden aus dem Zentrifugenglas über ein Perlonsieb mit einer Maschenweite von 0,125 mm^3 (ARTEMIA-SIEB der Firma NUOVO (4) ausgegossen und durch Überspülen mit 37° C warmer physiologischer Kochsalzlösung weitgehend gereinigt. Die Siebunterseite wird mit sterilen Zellstofftupfern abgesaugt, um die Meßgenauigkeit nicht durch anhaftende Flüssigkeitsmengen zu beeinträchtigen.

Die so vorbereiteten Knochenmarkbröckel befinden sich je nach der Menge des Aspirates einzeln oder gehäuft auf der Oberfläche des Siebes. Mit Hilfe eines Spiralbohrers, wir benutzten ein WURZELFÜLLINSTRUMENT nach LENTULO aus der Zahnmedizin, werden die Bröckel einzeln aufgenommen und an das plangeschliffene Ende der

Meßpipette gebracht und von dort aus mit leichtem Sog in das untere Innere der Pipette aspiriert.

Die Länge des Knochenmarkbröckelzylinders, der keine Luftbläschen enthalten darf, wird anschließend mit einer Schubleere bestimmt und das Ergebnis protokolliert. Aus der Kenntnis des lichten Durchmessers der Pipette läßt sich das Volumen des Knochenmarkzylinders nach der Formel

$$V = \pi r^2 \times h$$

bestimmen, wobei h der Länge des Bröckelzylinders entspricht.

Noch im gleichen Arbeitsgang wird das gemessene Bröckel in eine von einer Hilfsperson vorbereitete Deckglaskultur ausgeblasen. Dieses wird mit einem Tropfen Serum abgedeckt, mit einem Hohlschliffobjektträger bedeckt und die entstehenden Ränder mit Hartparaffin verschlossen. Nach Kennzeichnung der Kultur wird diese inkubiert.

Die Vorbereitung des Markbröckels bei der Spülung und der Volumenmessung sollte möglichst zügig ablaufen, die einzelnen Bröckel werden sonst klebrig und fadenziehend, die Kulturergebnisse mangelhaft. Dieses Phänomen hängt mit Gerinnungsvorgängen zusammen. Nach KEILHACK ist im menschlichen Knochenmark etwa 3 mal soviel Fibrinogen enthalten wie in peripherem Blut. (19)

Das wenig aufwendige Verfahren zur Volumenbestimmung muß unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden und bewirkt keine erkennbare mechanische Schädigung des Zellverbandes, da die Zeitspanne zwischen Punktion und Ansatz der Kultur relativ kurz gehalten werden kann.

IV TRYPSINAUFARBEITUNG, d. h. FERMENTATIVE BRÖCKELAUFLÖSUNG

Nach Ablauf von 24 Stunden wird die erste Kultur dem Brutschrank zu weiterer Bearbeitung entnommen und die zwei Objektträger durch Ablösen des Paraffinrandes voneinander getrennt. Die gesamte Kultur,

d. h. Nährlösung einschließlich ausgewanderter Zellen und Knochenmarkbröckel wird derart von ihrer Unterlage gespült, daß sie über eine Ecke des Objektträgers in einen bereitgehaltenen Trichter fließt. Das Abspülen von der Unterlage gelingt mit 3 bis 5 ml 37° C warmer physiologischer NaCl-Lösung, die aus einer 10 cm^3 Plastikspritze kommend mit feinem Strahl die Kultur von dem Objektträger löst. Das Auslaufrohr des Trichters ist mit einem Filter verschlossen, das die Knochenmarkbröckel auffängt und von dem Rest der Kultur trennt. Als Filter verwandten wir gewirkten Nylonhemdenstoff, der in aqua dest. aufbewahrt wurde. Der Filterrückstand besteht aus dem Koagulumhäutchen und dem Mutterstück der Kultur.

Die Spülflüssigkeit wird in einem Meßzylinder aufgefangen und enthält die Zellen, die den Bröckelverband während der Inkubationszeit verlassen haben. Bei sorgsamer Technik ist hierbei auf völlige Leerung des Auslaufrohres und möglichst geringe Benetzung der Innenwand des Meßzylinders zu achten. Dessen Volumen wird protokolliert: V_1.

Die weitere Bearbeitung erfolgt in zwei parallel verlaufenden Arbeitsgängen: während der Filterrückstand samt Filterblättchen in einem zweiten Meßzylinder mit 2 bis 4 cm^3 37° C warmer 0,025 % Trypsinlösung (Präparat TRYPURE NOVO STABILISIERT der Firma NUOVO-INDUSTRIE GmbH PHARMACEUTIKA) nach Verschluß mit einem Gummistopfen für 10 Minuten inkubiert wird, kann mit der Vorbereitung zur Auszählung des ersten Meßzylinders begonnen werden. Nach Verschluß des Zylinders mit einem weiteren Gummistopfen wird das etwa 3/4 volle Gefäß derart bewegt, daß der Inhalt abwechselnd von dem Oberrand zu dem Zylinderboden und zurück fließt. Dies geschieht durch eine gleichmäßige schwenkende Bewegung des angewinkelten rechten Unterarmes im Schultergelenk, etwa 20 mal während einer Minute. Nach 60 Sekunden wird ein Teil der so erzielten Zellaufschwemmung mit einer Leukozytenpipette aufgezogen und nach erneutem Durchmischen in der Pipettenkammer und Verwerfen der ersten Tropfen in eine Zählkammer gebracht.

V ZELLZÄHLUNG

Die Auszählung erfolgt analog der Blutzellbestimmung im Zählkammerverfahren. Wir benutzen das Kreuznetz nach SCHILLING, es werden jeweils 5 Felder ausgezählt und nach Dividieren der Gesamtzellzahl durch 5 der Mittelwert der ausgezählten Quadrate bestimmt (Mikroskop der Firma LEITZ, OK 12,5, Objektiv 25/065 Blaufilter). Bei der angegebenen Vergrößerung werden die kernhaltigen Zellen gezählt. Kernlose sind als Stechapfel-Erys kenntlich und gut zu unterscheiden. Sie können getrennt bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Gesamtmenge des Zylinderinhaltes V_1 stellt das Ergebnis eine quantitative Bestimmung derjenigen Zellen dar, die das Mutterstück seit Beginn der Inkubation verlassen haben (Z_M, mobile Zellen).

Nach einer Bebrütungszeit von 10 Minuten bei 37° C wird der zweite Meßzylinder dem Brutschrank entnommen und in der oben geschilderten Weise während 60 Sekunden etwa 35 bis 40 mal geschüttelt. Während dieser Zeit findet die Trypsin-bedingte Auflösung des Zellverbandes ihren Abschluß. Die Wirkung des Fermentes ist an der zunehmenden milchigen Trübung des Zylinderinhaltes und an dem Verschwinden des Knochenmarkbröckels zu sehen. Die vollständige Auflösung ist oft bereits nach etwa 50 Sekunden erfolgt. Lediglich bei einem Versuch gelang dies nicht, das Bröckel wurde nach Trennung von der Suspension für weitere 5 Minuten mit Trypsin inkubiert, wonach anschließend eine vollständige Lösung eintrat.

Kurz vor Ablauf der Schüttelzeit werden je 3 ml der Zellaufschwemmung mit einem Tropfen LUGOLSCHER LÖSUNG versetzt und nach kurzem Durchmischen wird der Meßzylinder etwa zur Hälfte in ein flaches Gefäß mit Eisstücken gestellt. Beide Maßnahmen verursachen eine Beendigung des fermentativen Prozesses; die so erhaltene Zellsuspension ist für ca. 30 Minuten gleichbleibend, d. h. die Zellzahl bleibt konstant. Nach erfolgter Bestimmung und protokollarischer Eintragung des Meßzylinderinhaltes V_2, unter Abzug des Filtrierblättchenvolumens, das zuvor ermittelt wurde, erfolgt die Durchmischung und Zählung der Zellaufschwemmung wie oben beschrieben. Das Er-

gebnis ist die Gesamtzellzahl der im Kernstück verbliebenen Zellen (Z_K, im Kernstück verbliebene Zellen).

Die Summe Z_M und Z_K ergibt die Gesamtzellzahl kernhaltiger Elemente der Kultur, bezogen auf das Volumen des anfangs bestimmten Knochenmarkbröckels. Nach Umrechnung mit dem jeweiligen Faktor kann das Ergebnis pro mm^3 Knochenmarkbröckel angegeben werden.

Spalte I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
LFD. NR	LFD. NR CLAUS	NAME GESCHL. ALTER	HÄMATOLOG. DIAGNOSE	BEBRÜTUNGS-ZEIT (h)	ANSATZMENGE IN mm^3	KULTURZUSATZ CORHORMON OD. HÜHNEREMBRYONALEXTRAKT	AUSGANGSWERT $10^6/mm^3$	ZELLZAHL $(Z_M + Z_K) \cdot 10^6/mm^3$ NACH INKUBATION	DAVON AUSGEWANDERTE ZELLEN IN % (Z_M)
1	A	4	H.G. ♂ 79 J	links verschobene Erythropoese, Megaloblastoide	24	3.24	CORH	0.48	0.194	
	B				24	2.52	CORH		0.24	
2	A	22	F.L. ♂ 78 J	Morbus Biermer	24	1.0	CORH	0.94	0.45	
3	A	17	B.S. ♀ 56 J	Reifungshemmung der Leukopoese	24	1.5	CORH	0.77	0.368	
	B				24	1.7	CORH		0.323	
4	A	19	K.M. ♂ 61 J	normales Knochenmark	24	1.0	CORH	0.83	0.495	
	B				24	1.05	CORH		0.33	
5	A	7	H.G. ♂ 56 J	normales Knochenmark	24	2.94	CORH	0.51	0.294	
	B				24	1.21	CORH		0.293	
	C				24	0.51	CORH		0.445	
6	A	43	J.F. ♀ 68 J	angeregtes Knochenmark	24	1.18	CORH	1.16	0.735	
	B				24	1.35	CORH		0.867	
	C				48	0.81	CORH		0.303	
7	A	37	E.K. ♀ 66 J	chronisch myeloische Leukämie	24	0.81	CORH	2.0	1.108	
	B				24	0.54	CORH		1.232	
8	A	45	L.S. ♂ 31 J	normales Knochenmark	24	0.4	CORH	0.69	0.748	
9	A	44	H.M. ♂ 36 J	normales Knochenmark	24	0.27	CORH	0.86	1.143	
10	A	5	H.W. ♂ 55 J	Granulopoese und Plasmazellen vermehrt	24	1.8	CORH	0.5	0.495	
	B				24	1.3	CORH		0.465	
	C				24	0.27	CORH		0.687	
	D				48	1.3	CORH		0.45	
	E				48	0.[illegible]	CORH		0.895	

Tab. II

Spalte I		II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
LFD. NR.		LFD. NR. CLAUS	NAME, GESCHL. ALTER	HÄMATOLOG. DIAGNOSE	BEBRÜTUNGS-ZEIT (h)	ANSATZMENGE IN mm^3	KULTURZUSATZ CORHORMON OD. HÜNNEREMBRYONALEXTRAKT	AUSGANGSWERT $10^6/mm^3$	ZELLZAHL ($Z_M + Z_K$) $10^6/mm^3$ NACH INKUBATION	DAVON AUSGEWANDERTE ZELLEN IN % (Z_m)
11	A	2	E.S. ♀ 65 J	hyperchrome Anämie	24	0.35	CORH	0.41	0.809	
	B				24	0.35	CORH		0.816	
	C				48	0 5	CORH		0 599	
	D				48	0 3	CORH		1 101	
	E				72	0 27	CORH		0 896	71
12	A	33	H.P. ♀ 21 J	angeregte Erythropoese	24	0.22	CORH	1.02	0 954	
13	A	26	E.K. ♀ 65 J	chronisch - myeloische Leukämie	24	0 27	CORH	1.56	2 664	59
	B				24	0 27	CORH		2 648	71
	C				48	0 27	CORH		1 906	68
	D				48	0 27	CORH		1 758	70
	E				72	0 27	CORH		1 329	81
	F				72	0.27	CORH		1.144	61
14	A	27/2	E.W. ♀ 57 J	Knochenmark angeregt	24	0.32	CORH	1.1	1.253	68
	B				24	0.27	CORH		1.178	59
	C				48	0.27	CORH		0.865	58
	D				48	0.27	CORH		0.859	61
	E				24	0.29	HEE		1.035	79
	F				24	0.29	HEE		0.952	66
	G				48	0.29	HEE		0.715	71
	H				48	0.27	HEE		0.654	74
15	A	14	E.S. ♀ 66 J	Knochenmark hypoplastisch, Erythropoese angeregt	24	0.27	CORH	0.65	0.592	75
	B				24	0 27	CORH		0.753	37
	C				48	0.27	CORH		0.530	43
	D				48	0.21	CORH		0.546	43
16	A	32	G.M. ♀ 62 J	Knochenmark unauffällig	24	0.27	CORH	0.85	0 503	40
17	A	12	E.S. ♀ 75 J	angeregte Erythropoese Granulopoese links verschoben	24	1.9	CORH	0.57	0.471	50
	B				24	0.27	CORH		1.152	53
	C				48	0 27	CORH		1.092	53
	D				48	0.4	CORH		0.723	45
	E				24	1.5	HEE		0.545	41
	F				24	0 27	HEE		1.131	75
	G				48	0.27	HEE		1.168	72
	H				48	0.95	HEE		0 589	69
18	A		L.L. ♀ 81 J	hämolytische Anämie, anteilmäßig vermehrte Erythropoese	24	0.27	CORH	0.9	1 139	66
	B				24	0 27	CORH		1 609	46
	C				24	0 27	CORH		1 643	44

Tab. II

Tab. II zeigt die bei routinemäßig vorgenommenen Sternalpunktionen ermittelten absoluten Zellzahlen pro mm^3 Knochenmarkbröckel (CLAUS, Sp. VIII).

Spalte IX und X zeigen mit insgesamt 58 Einzelmessungen die Änderung der absoluten Zellzahl kernhaltiger Zellen unter Kulturbedingungen und den entsprechenden prozentualen Anteil mobiler Zellen (Z_M).

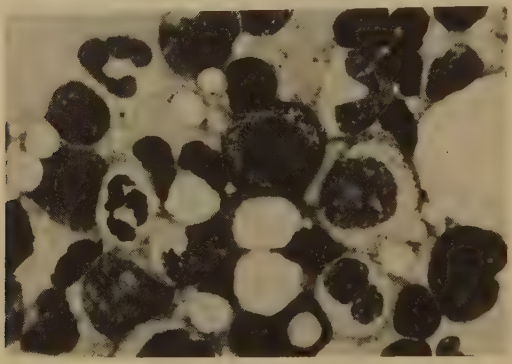

Abb. 2: Ausstrich eines Knochenmarkbrökkels, dessen Volumen wie auf S. 23 geschildert, bestimmt wurde. Pappenheim Färbung, Leitz Photomikroskop, Ölimmersion

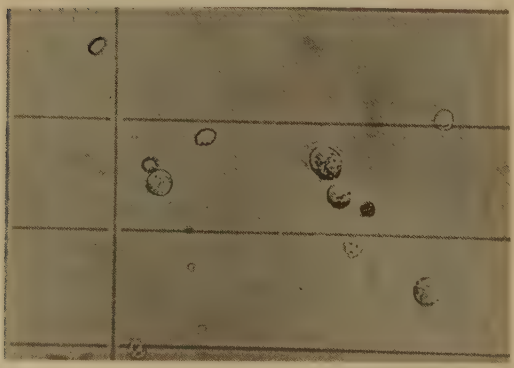

Abb. 3: Mobile Zellen des Randsaumes im Kreuznetz nach Schilling. 24 h nach Inkubation. Nativpräparat, Leitz Photomikroskop, OK 12,5, Objektiv 25/065

E ERGEBNISSE UND INTERPRETATION

Bei der Besprechung der Ergebnisse der absoluten Zellzählung von Knochenmark wird in der Literatur auf erhebliche Differenzen hingewiesen, gleichzeitig wird die Notwendigkeit einer genauen Bestimmung anerkannt. Infolge einer Schwankungsbreite bis zu 50 % ist aber die Aussagekraft derartiger Messungen gering (HALLMANN, ROHR). Die Ursache hierfür ist auf drei wesentliche Fehlerquellen zurückzuführen.

1. die unterschiedliche anatomische Struktur des Knochenmarkes
2. die Verunreinigung durch Beimengungen
3. mangelhafte Bröckelaufarbeitung

zu 1. die inselartige anatomische Struktur des hämopoetischen Gewebes innerhalb des Knochenmarkes bedingt eine unregelmäßige Verteilung von Parenchym und Bindegewebe. Dies ist eine der Ursachen des unterschiedlichen Verhaltens gegenüber der von uns benutzten natrium citricumhaltigen NaCl-Lösung, in die das Aspirat anfang gegeben wird. Der Teil mit höherem spezifischen Gewicht als 1,01 g/cm^3 sedimentiert, der Rest mit niedrigerem spez. Gewicht schwimmt an der Oberfläche der Flüssigkeit, der Zellgehalt beider Fraktionen ist unterschiedlich (CLAUS).

zu 2. infolge von Beimengungen von Sinus- und peripherem Blut zu den Knochenmarkbröckeln des Aspirates können erhebliche Irrtümer entstehen. Durch mehrfaches Überspülen der Bröckel, die sich hierzu auf einem Perlonsieb befinden, mit citrathaltiger physiologischer Kochsalzlösung, können derartige Bestandteile abgewaschen werden. Der Erfolg dieser Maßnahme ist an dem geringen Vorkommen von Erythrocyten im Ausstrich zu erkennen. Darüberhinaus wurden bei den Zählungen lediglich kernhaltige Rundzellen bestimmt.

zu 3. wichtigste Ursache der erheblichen Differenzen bei der absoluten Zellzählung ist die mangelhafte Aufarbeitung des Bröckelverbandes. Bei der mechanischen Gewebsaufarbeitung durch starkes Schütteln oder

Reiben mit Hilfe eines Magnetrührwerkes entstehen entweder ungenügend aufgelöste Zellkomplexe oder eine große Zahl vitaler Zellen wird zerstört, erkennbar durch das Auftreten nackter Zellkerne oder anderweitiger Zelltrümmer.

Die enzymatische Gewebsauflösung ist ebenfalls problematisch, zu hohe Fermentkonzentrationen greifen nicht nur das Zwischenzellgewebe an sondern bewirken auch eine Zerstörung der Zellen selbst; ungenügende Fermentkonzentrationen verursachen größere nicht auszählbare Verbände.

Die Anwendung von Trypsin in einer Konzentration von 0,025 % bei konstanter Wirkzeit von 10 Minuten und einer anschließenden Schüttelzeit von 50 bis 60 Sekunden ist nach unserer Beobachtung ausreichend und den bekannten physikalischen Aufarbeitungen vorzuziehen. Es gelingt hierbei eine völlige Auflösung des Bröckelverbandes bei genügender Schonung der Zellen des hämopoetischen Gewebes innerhalb kurzer Zeit. Geeignete Substanzen wie die LUGOLSCHE LÖSUNG und anschließende Kühlung mit Eiswasser beenden den enzymatischen Vorgang ausreichend schnell und anhaltend (Abb. 1).

I GETRENNTE BESTIMMUNG MOBILER ZELLEN DES KNOCHENMARKBRÖCKELS

Die fraktioniert vorgenommene Auszählung der Bröckelkulturen erlaubt eine gesonderte Beurteilung derjenigen Zellen, die bei Reifungs- und Teilungsvorgängen den Zellverband verlassen haben und makroskopisch als Randsaum erkennbar sind, gegenüber den Zellen, die weiterhin das Mutterstück bilden und erst nach fermentativer Auflösung ausgezählt werden können. Bei prozentualer Aufteilung scheint die Zahl ausgewanderter Zellen gegenüber den im Bröckelverband verbliebenen über 72 Stunden zuzunehmen.

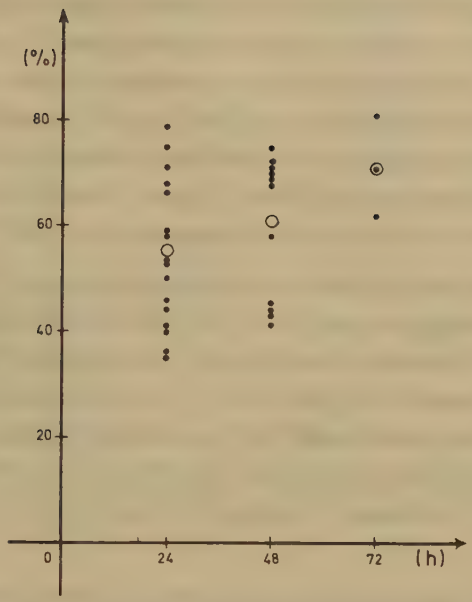

Abb. 4 zeigt die Verteilung der Einzelmessungen (.) und die Durchschnittswerte (o) des prozentualen Anteiles mobiler Zellen in % gegenüber den im Bröckelverband verbliebenen kernhaltigen Elementen pro mm^3 Knochenmarkbröckel nach 24, 48 und 72stündiger Inkubation. Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte von 30 Messungen ohne Berücksichtigung des Verhältnisses einzelner Kulturen in Bezug auf das Wachstum oder die klinische Diagnose des Patienten.

II ABHÄNGIGKEIT DER GESAMTZELLZAHL VON DEM VOLUMEN DES INKUBIERTEN BRÖCKELS

Die in unserem Rahmen durchgeführte Methode einer 3 Tage-Deckglaskultur zur Überlebenderhaltung menschlichen Knochenmarkes reicht für kurzfristige Beobachtungen im Zusammenhang mit der hämatologischen Diagnostik aus.

Grundbedingung einer erfolgreichen invitro Züchtung ist das geeig-

nete Verhältnis von Kultursubstrat zu dem Kulturmedium. Diese Relation ist stoffwechselabhängig und betrifft sowohl die qualitative Zusammensetzung als auch das Verhältnis der gesamten Nährflüssigkeit, also Serum, Corhomon und Plasma zu dem Bröckelvolumen. Die Menge des Kulturmediums wird im Routineverfahren annähernd konstant gehalten, dies geschieht durch die gleichmäßige Benutzung von Tropfpipetten derselben Größe. Demgegenüber variiert das Bröckelvolumen je nach Gehalt des Aspirates von Kultur zu Kultur. Dieser Vorgang konnte während unserer Messungen beobachtet und ausgewertet werden.

Die Bestimmung von 15 Kulturen der laufenden Nummer 1 bis 7 und 7 weiterer Kontrollkulturen der lfd. Nr. 10 ABD, 11 C, 17 AEH zeigt keine Zunahme der Gesamtzellzahl nach 24 und 48stündiger Bebrütung gegenüber dem Ausgangswert (Spalte VIII). Die vor der Inkubation gemessenen Bröckelvolumina (Spalte VI) lagen hierbei zwischen 0,5 und 3,24 mm^3. Mit zwei Ausnahmen (Vers. lfd. Nr. 11 C und 17 H) lagen die gemessenen Werte (Spalte IX) zwischen 30 und 100 % des Ausgangswertes.

- Dieser Abfall der Gesamtzellzahl wurde fast ausschließlich bei größeren Bröckelmengen gefunden. Er ist Ausdruck mangelhafter Stoffwechselvorgänge des Kultursubstrates. Eine Parallele hierzu ist in der zentralen Nekrose von Fibroblastenkulturen zu finden.

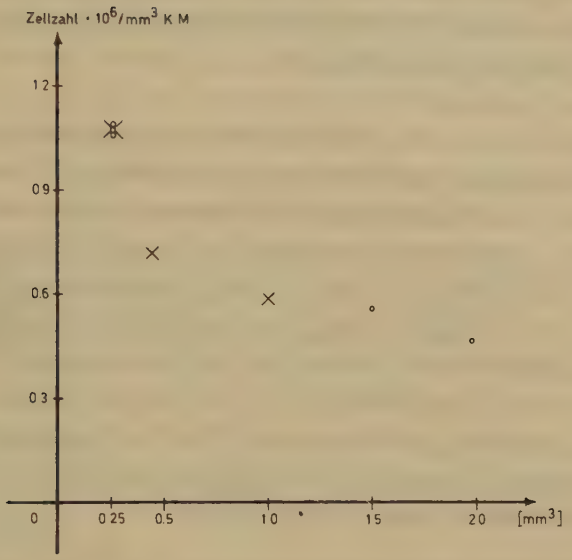

Abb. 5 Abhängigkeit der Gesamtzellzahl pro mm^3 Knochenmark von dem Volumen des inkubierten Bröckels.
0 - 24 Stundenwerte)
x - 48 Stundenwerte) der Kultur Nr. 17 A - H

Erst bei kleineren Ansatzmengen als 0,4 mm^3 ist eine Zunahme der absoluten Zellzahl unter Koagulum-Kulturbedingungen zu beobachten. Mit den von uns zur Volumenbestimmung benutzten Pipetten lassen sich Bröckel in einer Größe von 0,27 bis 0,32 mm^3 ausreichend genau messen (Standardvolumen der Kulturen Nr. 9 bis 18 = 0,27 mm^3). In diesen Kulturen ist ein deutlicher Anstieg der Gesamtzellzahl nach 24 und 48stündiger Bebrütung zu erkennen.

Dieser Zusammenhang weist darauf hin, daß die günstigsten Wachstums- und Differenzierungsvorgänge der hier angewandten Deckglaskultur bei Bröckelvolumina liegen, die unter 0,4 mm^3 betragen.

III ZELLZAHLBESTIMMUNG UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER KULTURMEDIEN WIE CORHORMON UND HÜHNEREMBRYONALEXTRAKT

Für die zuvor beschriebene Deckglaskultur wurde anfänglich ein standardisierter steriler Zusatz von Hühnerembryonalextrakt, einem Gemisch aus 8 Tage bebrüteten Hühnereiern benutzt. Bei den Kulturen der lfd. Nr. 1 bis 18 wurde stattdessen Corhormon, ein Extrakt embryonaler Pferdeherzen angewandt. Vergleichende Messungen der Kulturen Nr. 14 E - H und 17 E - H, die in parallelen Bestimmungen jeweils mit Hühnerembryonalextrakt oder Corhormon angesetzt waren, weisen während 24 und 48stündiger Bebrütung keinen deutlich erkennbaren Unterschied in der Gesamtzellzahl auf. Darüberhinaus ist bei den 8 Doppelbestimmungen das Verhältnis ausgewanderter zu den im Verband gebliebenen Zellen annähernd gleich.

In Übereinstimmung mit den cytologischen Ausstrichpräparaten stellt sich bei der quantitativen Zellzahlbestimmung kein Unterschied bei der Verwendung von Hühnerembryonalextrakt oder Corhormon als Kulturmedium während einer 48stündigen Inkubationszeit dar.(3)

IV BAKTERIELLE VERUNREINIGUNGEN

Nach erfolgter Sternalpunktion muß die gesamte Präparation der Bröckel und die anschließende Bearbeitung der Knochenmarkkulturen unter aseptischen Bedingungen vorgenommen werden. Bakterielle Verunreinigungen können oft bereits makroskopisch einen sichtbaren Unterschied gegenüber sterilen Kulturen aufweisen: ihr Randsaum, die Auswanderungszone um das Mutterstück ist nach 24stündiger Bebrütung sichtbar kleiner und durchscheinender, das heißt gegenüber einer sterilen Kultur ist die Zahl ausgewanderter oder ausgewachsener Zellen vermindert. (Vergleichswerte der Versuche Nr. 4 B, 11 C gegenüber sterilen Versuchen unter gleichen Bedingungen.)

V REPRODUZIERBARKEIT DER METHODE

Bei den Versuchen der lfd. Nr. 11 AB, 13 AB, 14 CD, 15 CD, 18 BC wurden für Kontrollzwecke jeweils zwei Kulturen bestimmt. Die gemessenen Bröckel enthielten hierbei unterschiedliche Volumina, zum Teil gelang es, gleichgroße Bröckel zu bestimmen und zum Teil konnten größere Bröckel zertrennt und gesondert bearbeitet werden. Stets erfolgten die Messungen vom Beginn der Kultur an bis zur Bestimmung in der Zählkammer parallel, d. h. unter gleichen äußeren Bedingungen.

Die Reproduzierbarkeit der Methode ist durch die geringe Differenz der Ergebnisse der aufgeführten Kulturen von weniger als 3 % Abweichung der Einzelmessungen voneinander nachweisbar.

F) DISKUSSION

I VERGLEICH MIT DER ABSOLUTEN ZELLZAHL NACH PUNKTION

Die oben beschriebene Zellzählung hält sich in ihrem gemeinsamen Bezugspunkt, der Volumenmessung an die von CLAUS, in Anlehnung an DULBECCO und YONGNER geschilderte Methode. Die Bestimmung des Rauminhaltes wird der des Gewichtes vorgezogen. Hauptgrund hierfür liegt in der schnelleren und für den Gewebsverband schonenderen Handhabung dieser physikalischen Messung. Die weitere Bearbeitung einschließlich der Ermittlung nach dem Zählkammerverfahren ist bis auf die Anwendung geringerer Fermentkonzentrationen gleich.

Legt man die unmittelbar nach der Sternalpunktion gewonnene Zellzahl zugrunde, so ist die quantitative Verlaufsbeobachtung einer Knochenmarkbröckelkultur über 24 bis 72 Stunden unter bestimmten Voraussetzungen möglich (Versuch Nr. 11 A - E und 13 A - F). Neben gleichartiger Technik ist die anatomische Struktur des Markes zu beachten. Sorgfältige Präparation, Verwendung kleiner, möglichst gleichgroßer Bröckelmengen und die Berücksichtigung physikalischer Eigenschaften, wie z. B. des spezifischen Gewichtes, sind für eine exakte

Bestimmung erforderlich.

Die Einhaltung dieser Kriterien ist durch die gleichzeitige Auszählung von Doppelkulturen zu überwachen. Wir führen aus diesem Grunde, wenn es die Menge der bei der Sternalpunktion gewonnenen Knochenmarkbröckel erlaubt, stets eine zweite Messung durch, so daß für eine Verlaufsbeobachtung über 72 Stunden neben dem Ausgangswert mindestens 6 Kulturen zu bestimmen sind.

II DIE QUANTITATIVEN ERGEBNISSE DER VERLAUFSBEOBACHTUNG

Die vergleichende Zellzählung und Bestimmung der Kulturen Nr. 8 bis 18 mit insgesamt 36 Einzelmessungen weist stark variierende Ergebnisse auf. Unter Zugrundelegung annähernd konstanter Bröckelmengen, 0,4 mm^3, wird neben wesentlich geringerem Wachstum eine Zunahme kernhaltiger Zellen nach 24 Stunden bis zu 102 %, Kultur Nr. 17 B, nach 48 Stunden bis zu 168 %, Kultur Nr. 11 D und nach 72 Stunden bis zu 118 %, Kultur Nr. 11 E beobachtet. Die angegebenen Zahlen sind Höchstwerte unter Berücksichtigung der von CLAUS gefundenen absoluten Zellzahl von Knochenmarkaspiraten. Die relativ große Schwankungsbreite dieser Angaben kann zum Teil dadurch erklärt werden, daß nicht dieselben Markproben mehrfach gezählt wurden und daß nicht kontrolliert wurde, ob die verwendeten Bröckel denen ähnelten, die für die Messung an nativem Mark benutzt wurden. Dies kann bei teils schwimmendem, teils sedimentierendem Knochenmark zu großen Differenzen führen.

Vergleichsweise hohe Angaben sind von J. CLEMMENSEN und C. MUNK PLUM für Flüssigkeitskulturen von pathologisch verändertem Knochenmark beschrieben, die Ergebnisse wurden bei der perniziösen Anämie und Leukosen gewonnen. Die Autoren fanden bei auf 30.000 Zellen pro mm^3 eingestellten Knochenmarkzellaufschwemmungen nach 6 Stunden eine Vermehrung kernhaltiger Elemente von 20 % (5).

Die getrennte Bestimmung während der Inkubation zeigt eine Zu-

nahme mobiler Zellen gegenüber den stationären Elementen des Verbandes. Während der relative Anteil der Zellen des Randsaumes pro mm^3 Knochenmarkbröckel nach 24stündiger Bebrütung durchschnittlich 55 % betrug, werden nach 48 h 61 % und nach 72 h 71 % gefunden (Abb. 2).

Eine gemeinsame Tendenz während der Verlaufsbeobachtung von Knochenmarkbröckelkulturen über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden ist den 36 Einzelmessungen in Hinsicht auf eine definierbare Zellzahlvermehrung nicht zu entnehmen. Die zum Teil erhebliche Zunahme kernhaltiger Rundzellen weist lediglich nach, daß unter den geschilderten Kulturbedingungen Teilungsvorgänge ablaufen.

Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Kriterien sollte die quantitative Verlaufsbeobachtung und Interpretation von Fall zu Fall durchaus möglich und anhand vergleichender Untersuchungen und spezieller Fragestellungen anwendbar sein. Daneben besteht Gelegenheit, die Wirkung äußerer Einflüsse invitro auch quantitativ zu erfassen.

Um allgemeingültige Parameter für das Wachstum von Knochenmarkkulturen zu gewinnen und so Rückschlüsse auf Wachstums- und Teilungsvorgänge hämatopoetischen Gewebes invivo ziehen zu können, ist die Zahl der von uns untersuchten Knochenmarkpunktate zu gering. Darüberhinaus scheint die Verwendung von Flüssigkeitskulturen geeigneter zu sein, da aus derselben Kultur fortlaufend Proben entnommen werden können.(2) Unabhängig von den methodischen Problemen der Aufarbeitung und Zählung ist die Kenntnis der Zellzahlvermehrung unter physiologischen Bedingungen erforderlich. Geeignete Voraussetzungen vergleichender Messungen sind jedoch nur in einem hämatologisch gleichwertigen Kollektiv erfüllt, das nicht durch Alter, Geschlecht, Art und Schwere einer Erkrankung sowie unterschiedlich therapeutische Maßnahmen variiert.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorgelegte Arbeit zeigt eine Methode auf, die es gestattet, Knochenmarkbröckelkulturen über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden quantitativ zu verfolgen. In Fortführung der Arbeiten von DULBECCO und YOUNGNER über die fermentative Auflösung von Zellverbänden gelingt es nach Volumenbestimmung und anschließender Inkubation, die Knochenmarkbröckel mit Hilfe von Trypsin aufzulösen. Die erhaltene Zellaufschwemmung wird getrennt von den Zellen des Bröckelverbandes bestimmt, die als Ausdruck von Reifungs- und Teilungsvorgängen das Mutterstück bereits verlassen haben. Die Auszählung erfolgt im Zählkammerverfahren, das Ergebnis wird in Zellzahl pro mm^3 Knochenmarkgewebe angegeben und ist reproduzierbar.

Anhand von Parallelversuchen wird die Abhängigkeit der Zellvermehrung von dem Volumen des Knochenmarkbröckels der Deckglaskultur aufgezeigt: Bröckelmengen über 0,4 mm^3 wirken sich auf die Zunahme kernhaltiger Zellen nachteilig aus.

Während der Bebrütungszeit von 72 Stunden ist eine relative Vermehrung frei suspendierter Zellen gegenüber den im Kernstück verbliebenen Elementen zu beobachten.

Die Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien wie CORHORMON und HÜHNEREMBRYONALEXTRAKT läßt keine quantitativen Unterschiede nach 24 und 48stündiger Inkubation erkennen.

Für die Reproduzierbarkeit der Befunde spricht, daß die Ergebnisse unabhängig von der anfangs gemessenen Bröckelmenge übereinstimmen.

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie EURATOM-GSF, Nr. 031-64-1 BIAD.

LITERATURVERZEICHNIS

Lit.Nr.		
(1)	ALBRECHT, A. BOLL, I.	Untersuchungen über die Einwirkungen von Colchizin, arseniger Säure, Stickstofflost und Aethylenurethan auf menschliches Knochenmark invitro ÄRZTLICHE WOCHENSCHRIFT, 5. Jahrgang, Heft 27, 1950
(2)	BERMANN, L. and POWSNER, E. R.	Review of Methods for Studying Maturation of Human Erythroblasts in Vitro: Evaluation of a New Method of Culture of Cell Suspensions in a Clot-Free Medium. BLOOD, VOL 14, No 11, Nov. 1959 U.S.A.
(3)	BOLL, I. und FUCHS, G.	Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark invitro BLUT, ZEITSCHR. FÜR BLUTFORSCHUNG, Bd. VII S. 257 - 272 (1961)
(4)	CLAUS, D.	Die Bestimmung der absoluten Zellzahl von Knochenmarkaspiraten. INAUGURAL-DISSERTATION AUS DER I. INNEREN ABTEILUNG DES STÄDT. KRANKENHAUSES BERLIN-NEUKÖLLN DRUCK: ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT, DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE (1968)
(5)	CLEMMENSEN, J. and C. MUNK PLUM	A Simplified Method for Invitro Examination of the Erythropoesis of Bone Marrow Applied to Cases of Pernicious Anaemia and Leukosis ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVIA 1952, Vol 25 Fasc. 2 - 3
(6)	EGEBLAD, K. and ASTRAP, T.	Fibrinolysis and the Trypsininhibitor in Human Urine SCANDINAV. J. CLIN. & LAB. INVESTIGATION 181 - 190, 18, 1966
(7)	FIESCHI, A. und ASTALDI, G.	Die Züchtung des normalen menschlichen Knochenmarkes invitro ARCHIV FÜR EXP. ZELLFORSCHUNG 24/1941

Lit.Nr.		
(8)	FRIEDERICI, L.	Das Verhalten menschlichen Knochenmarkes in Gewebekultur FOLIA HAEMATOLOG. 74, 1, 1956
(9)	FUCHS, G.	Mathematische Theorie der Entwicklung einer invitro isolierten Knochenmarkpopulation und deren Anwendungsmöglichkeiten BLUT, ZEITSCHRIFT FÜR BLUTFORSCHUNG, Bd. XI 1965, S. 267 - 283
(10)	HALLMANN, L.	Klinische Chemie und Mikroskopie G. THIEME-VERLAG STUTTGART, 10. Aufl. 1966
(11)	HYANEK, J., R. NOSKOVA und Z. CAFOURKOVA	Die Trypsin-Inhibitoraktivität der Muttermilch in der ersten Woche nach der Entbindung. ANN. PAEDIAT. 204: 125 - 137 (1965)
(12)	JANDER, G. und SPANDAU, H.	Kurzes Lehrbuch der anorganischen und allgemeinen Chemie. SPRINGER VERLAG, BERLIN-GÖTTINGEN-HEIDELBERG 5. Aufl. 1958
(13)	LEUTHARD, F.	Lehrbuch der physiologischen Chemie, de GRUYTER VERLAG BERLIN, 15. Aufl. 1963 S.
(14)	LIMBURG, H. und M. KRAHE	Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neue Cytostatika DTSCH. MED. WO.-SCHR. 89. Jahrgang: 1938 (1964)
(15)	PAUL, J.	Cell and Tissue Culture, 3. Edition E & S LIVINGSTONE LTD, EDINBURG AND LONDON
(16)	RERABEK, I. und RERABEK, E.	Leitfaden der Gewebezüchtung. VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA 1960
(17)	RIMON, A., SHAMASH, Y., and SHAPIRO, B.	The Plasmin Inhibitor of Human Plasma, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol 241, Nr. 21, Issue of november 10. pp 5102 - 5107, 1966
(18)	ROHR, K.	Das menschliche Knochenmark, THIEME VERLAG STUTTGART, 1963, 3. Aufl.

Lit.Nr.

(19) SCHUMANN, G. Leitfaden der Morphologie des Knochenmarkes, G.-THIEME VERLAG LEIPZIG 1950

(20) WEICKER, H. Handbuch der Kinderheilkunde, H. OPITZ/F. SCHMIDT Kapitel: Knochenmark S. 621 - 660 Bd. IV SPRINGER VERLAG BLN.-HEIDELB.-N.Y.

Frau Prof. Dr. med. I. Boll danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die Anleitung, wissenschaftlich zu arbeiten.

Daneben bedanke ich mich bei Herrn K. Lehmann im Eichamt Berlin-Charlottenburg für die freundliche Unterstützung bei der Volumenbestimmung der von uns benutzten Meßpipetten.

LEBENSLAUF

Am 1. September 1937 wurde ich in Berlin als Sohn des praktischen Arztes Dr. Hans Ramdohr und seiner Ehefrau Erika Ramdohr, geb. Lipsius geboren. Bis zur Einschulung 1945 verlebte ich meine Kindheit bei meinen Großeltern in der Ostprignitz, da mein Vater im Felde stand. Nach dessen Rückkehr aus russischer Kriegsgefangenschaft 1948 besuchte ich in Berlin die 4. Oberschule Technischen Zweiges bis zur Mittleren Reife, 1959 bestand ich als Extraner das Abitur und begann das Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. In den vorklinischen Semestern hatte ich noch die Ergänzungsprüfung zur Reifeprüfung, das Kleine Latinum, zu absolvieren. Im September 1967 folgte die ärztliche Prüfung an der Freien Universität Berlin und in den anschließenden zwei Jahren setzte ich meine Ausbildung als Medizinalassistent fort und erhielt im Oktober 1969 die Bestallung als Arzt.

Zur Zeit bin ich Assistenzarzt an der Inneren Abteilung des St. Joseph-Krankenhauses in Berlin-Tempelhof. Es ist mein Wunsch, die Arbeit meines Vaters als praktischer Arzt fortzuführen.

Hans-Peter Ramdohr

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33